

# HTRA1変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連

- 正常なHTRA1

■ 正常なプロテアーゼ活性

- 遺伝子変異のあるHTRA1

□ 軽度のプロテアーゼ活性低下

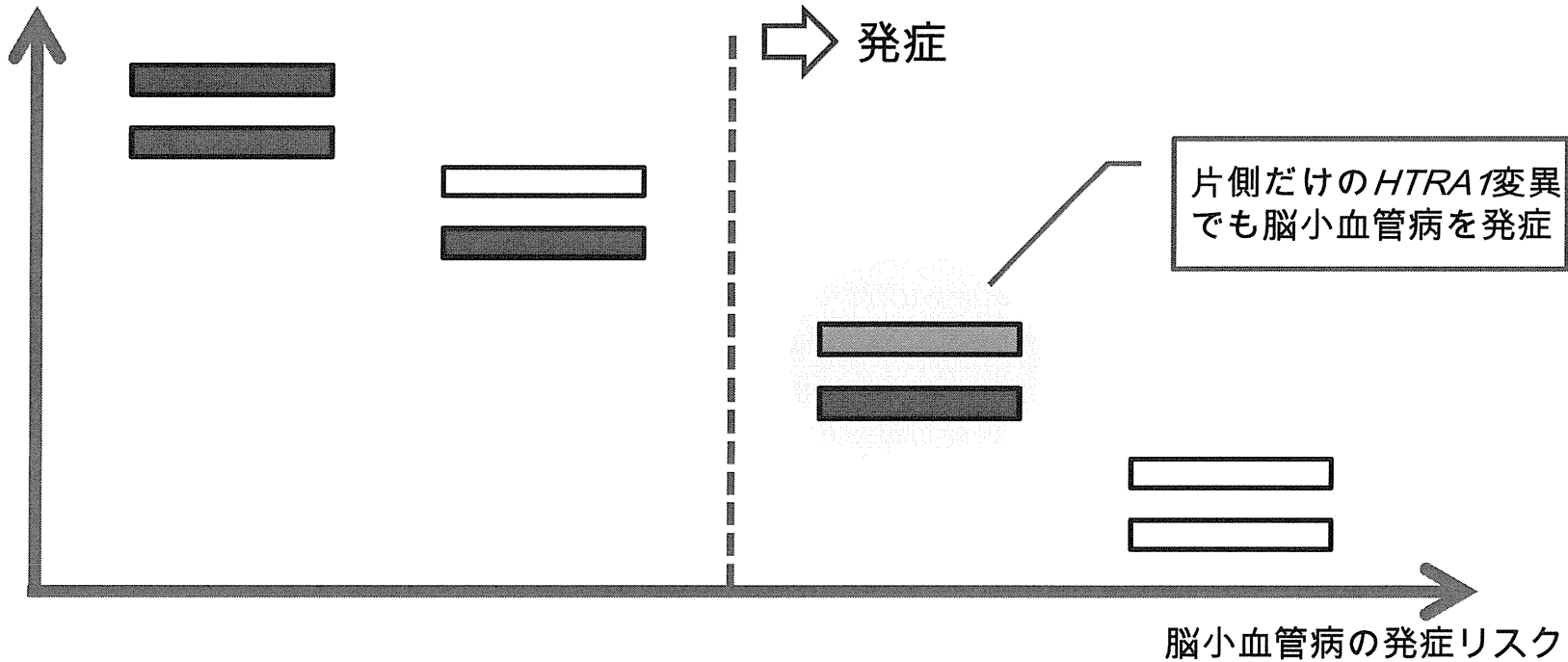
■ 高度のプロテアーゼ活性低下

- ヒトでは遺伝子は1対存在する

■ ■ 正常なヒト

■ ■ 遺伝子変異のあるヒト

HTRA1のプロテアーゼ活性



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

2光子励起レーザー顕微鏡を用いた脳微小循環障害の解析に関する研究

分担研究者 富本 秀和 三重大学神経病態内科学・教授  
研究協力者 矢田健一郎 三重大学神経病態内科学・講師

研究要旨

慢性・急性の虚血脳における微小循環動態を、2光子励起レーザー顕微鏡を用い観察した。急性虚血脳では、再灌流後に白血球の rolling、adhesion、血小板血栓の形成が認められた。一方、慢性低灌流脳では遷延性に白血球の rolling、adhesion が認められたが、血栓形成は認めなかった。Scale 処理による深部微小循環の観察では、白質で血管密度が低下し、慢性脳低灌流で低下がより顕著になることが示された。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管症の病態解明には、脳小血管の循環動態を *in vivo* で評価することが有用である。急性虚血後の脳微小循環動態の変化は報告があるが、慢性脳虚血では未解明である。そこで、一過性全脳虚血モデルと慢性脳低灌流モデルを作成し、微小循環動態を2光子励起レーザー顕微鏡で観察した。

2光子励起レーザー顕微鏡は、従来の共焦点レーザー顕微鏡に比して、生体組織の断層イメージを数百 $\mu\text{m}$ までの比較的深部まで *in vivo* で観察できる。さらに、*ex vivo* ではあるが死後脳を高浸透液で処理することにより、脳深部の微細構造を観察することが可能となる。本研究では、これらの方法を応用して脳灌流圧低下時の微小循環の変化を、脳深部まで連続的に検討する。

B. 研究方法

Actin promoter 領域に GFP を遺伝子導入したマウス(Green mouse)を用いて、急性・慢性脳虚血モデルを各々作成した。Green mouse では、白血球、血小板、内皮細胞は GFP 陽性細胞として観察可能、また Texas Red 標識 dextran を静脈内投与することにより、赤血球は Texas Red 欠損影として観察可能である。この赤血球の移動を line scanning することにより、血流速度 velocity を測定する。

急性脳虚血(一過性全脳虚血)モデル

両側総頸動脈に交連した絹糸を牽引することにより、段階的に脳低灌流状態を作成した。左大脳を開頭し、閉塞前、左総頸動脈閉塞、右総頸動脈閉塞、

両側総頸動脈再開通までの状態を2光子励起レーザー顕微鏡を用いて連続的に観察した。

慢性脳低灌流モデルの *in vivo* 観察

両側総頸動脈の外側からマイクロコイル(内径 0.18 mm)を装着、または結紮して狭窄性病変を作成し、各種の組み合わせ(両側頸動脈コイル狭窄群、左頸動脈結紮群、左頸動脈結紮+右頸動脈コイル狭窄群)で脳血流の低下程度をコントロールした。左大脳を開頭し狭窄性病変を作成後 30 分から一週間まで、2光子励起レーザー顕微鏡で観察を行った。

慢性脳低灌流モデルの *ex vivo* 観察(Scale 法)

Green Mouse で作成した BCAS、または偽手術脳を 4%paraformaldehyde(PFA)にて灌流固定した。取り出した脳を後 4%PFA で後固定し、20% sucrose で 24 時間浸漬した。その後、OTC コンパウンドで包埋し、液体窒素で凍結した脳を 4%PFA で再固定し、Scale (4M Urea, 10% Glycerol, 0.1% Treiton X-100)に一週間浸透した。Scale 処理した脳を二光子レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

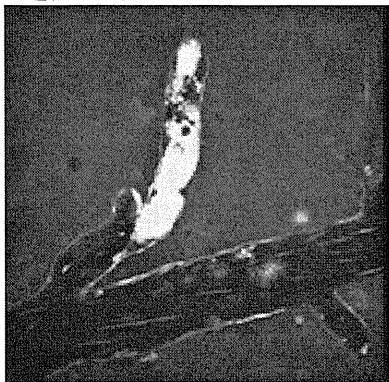
急性虚血脳

左総頸動脈閉塞に伴い、velocity はほぼ半分程度まで低下した。さらに、右総頸動脈閉塞を加えることにより、velocity は著明に低下したが、完全に停止することはなかった。Velocity の低下した状態でも白血球の rolling や adhesion、血小板血栓などの形成は認めなかった。両側総頸動脈閉塞後、10分程度でほ

ば血流は停止した。再開通に伴い脳血流は再開したが、velocity は閉塞前の 50%程度に留まった。

再開通後の観察では、細動脈レベルでは、明らかな異常所見を認めなかったが、細静脈レベルでは著明な白血球の rolling、adhesion が認められた。また、再開通早期に、細静脈レベルで血小板血栓の急激な形成が認められた(図 1)。

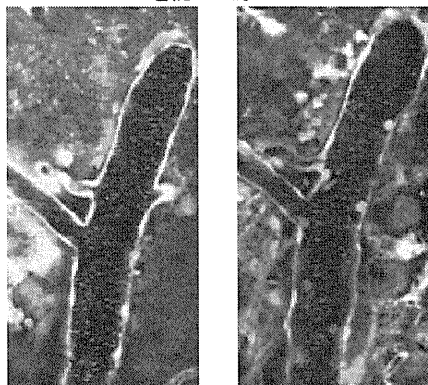
図 1: 再灌流後の細静脈。再灌流後に血小板血栓の急激な形成を認める。



#### 慢性虚血脳

偽手術群と比較して、velocity は両側頸動脈コイル狭窄群と左頸動脈結紮群では約 33%まで低下し、左頸動脈結紮+右頸動脈コイル狭窄群では、約 21%まで低下した。血管壁での白血球の rolling や adhesion は、中等度に血流が低下した両側頸動脈コイル狭窄群と左頸動脈結紮群で高頻度に確認された(図 2)。この状態は慢性脳低灌流一週間後でも遷延性に認められ、動脈・静脈いずれにも存在したが特に静脈側で顕著であった。

図 2: 虚血前(左)に比較し慢性虚血脳(右)では白血球の rolling、adhesion を認めた。



Scale 処理した Green マウス脳の実験系では、脳深部の微小血管を GFP 陽性構造として確認できた。二光子レーザー顕微鏡を用いて、脳表から海馬レベルまでの微小血管を観察深度を変えて連続的に観

察可能であった。

偽手術マウスでは、海馬から白質にかけての脳深部で微小血管の密度が低下した。BCAS マウスでは、これらの領域の密度低下がさらに顕著となった。

#### D. 考察

急性虚血脳では、再灌流に伴い白血球の rolling、adhesion が認められ、また血小板血栓の形成が認められた。一方、慢性虚血脳では、遷延性に白血球の rolling、adhesion が認められたが、著明な血小板血栓の形成などは認められなかった。慢性虚血脳では微小循環障害は存在するものの、梗塞に至るような高度の微小循環不全は伴わず、急性虚血脳の微小循環動態とは異なっている。

Scale 処理した脳では深部の微小血管密度は大脳皮質より大脳白質や海馬で疎であり、慢性脳低灌流負荷によってこの傾向が増強した。

#### E. 結論

慢性脳虚血の微小循環障害の特徴を in vivo で明らかにした。また、TM の白質病変治療薬としての可能性を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ・ 富本秀和: 皮質下血管性認知症の診断と治療。臨床神経学 2010 50(8): 539-546
- ・ 富本秀和: 慢性脳虚血と認知症: 慢性脳低灌流モデルを用いた解析。老年期認知症研究会誌 2010 17: 53-56
- ・ 富本秀和: 皮質下血管性認知症、認知症疾患における位置づけ。臨床神経学、印刷中

##### 2. 学会発表

- ・ 矢田健一郎、溝口明、富本秀和: 二光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス脳低灌流状態における血行動態の評価。日本神経学会総会、平成 22 年
- ・ 矢田健一郎、溝口明、新堂晃大、富本秀和: 二光子励起レーザー顕微鏡を用いた頸動脈閉塞症の微小循環動態の解析。日本脳卒中学会、平成 23 年

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得; なし。
2. 実用新案登録; なし。
3. その他; 特記すべきものなし。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

# 脳小血管における循環不全:急性 vs 慢性虚血

一過性全脳虚血モデル

慢性脳低灌流モデル

二光子励起レーザー顕微鏡による脳微小循環障害の観察

Scale処理による大脳深部  
白質の微小循環の可視化

急性虚血脳

血流速度の低下  
白血球のrolling, adhesion  
血栓形成

慢性虚血脳

血流速度の低下  
白血球のrolling, adhesion

慢性虚血脳では白質に著しい微小循環不全を示すが、血栓形成は認めない

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

血液脳関門の研究(モデル動物)

に関する研究

分担研究者 伊東 史子 東京薬科大学生命科学部・心血管医科学研究室

## 研究要旨

血管内皮細胞において、TGF- $\beta$  シグナルは細胞膜上の I 型受容体 (ALK1, ALK5) のバランスにより血管新生を制御している。血管新生における TGF- $\beta$  シグナルの役割の詳細を明らかにするために、シェアストレスや低酸素条件下で TGF- $\beta$  シグナルの影響を検討した。シェアストレスや TGF- $\beta$  シグナルによって miRNA の発現が強く変動したことから、血管新生における miRNA の役割を生体で解析した。さらに、血管から派生するリンパ管構造にも着目し、TGF- $\beta$  シグナルシグナルが血管構造だけでなくリンパ管構造の安定化に必須のシグナルであることを明らかにした。

### A. 研究目的

TGF- $\beta$  シグナルは、細胞膜上の I 型 II 型受容体を介して伝達され、血管新生を正負両面から制御している。特に TGF- $\beta$ /ALK5/Smad2/3 シグナルは血管構造の安定に必須である。しかしながら、TGF- $\beta$  シグナルによる厳密な制御機構の詳細については不明瞭な点が多く、解明する必要があった。また、発生期のリンパ管は大静脈から分岐することがわかっているが、血管を安定化させるシグナルである TGF- $\beta$  の関与については未解明であり、血管内皮細胞とともにリンパ管内皮細胞への影響についても解明する必要があった。

### B. 研究方法

血管内皮細胞特異的 TGF- $\beta$  シグナル (ALK5, TRII, Smad2/Smad3 ダブルシグナル) 欠損マウス (Tie2-Cre マウスとの交配) より、血管内皮細胞を樹立した。この細胞

を用いて低酸素条件下やシェアストレス負荷といった生体条件に近い状態で TGF- $\beta$  シグナルの動態を検討した。TGF- $\beta$  シグナルによって制御される分子をマイクロアレイ解析、および miRNA アレイ解析を行った。

また、TGF- $\beta$ /ALK1 シグナルにより誘導される分子 Id1 に注目し、血管新生に関与する分子 CGI-128 を yeast two hybrid 法を用いて同定しその機能を解析した。

### C. 研究結果

動脈圧シェアストレス負荷による細胞の挙動を検討したところ、シェアストレスにより Smad2 がリン酸化されていることを見出した。さらに、miRNA アレイ解析からは、シェアストレスにより強く誘導される miRNA の中には ALK1 の発現を強く抑制する分子があることを見出した。そこで、実際に生体において miRNA が血管新生に

関与しているかを検討するために、miRNAの成熟に必須である Dicer を血管内皮細胞特異的に欠損させ、血管構造への影響を検討した。このマウス(Dicer<sup>F/F</sup>; Tie2-Cre)は胎生 14.5 日までに胎生致死であり、血管ではなく血液細胞分化に異常をきたしていた。つまり、血管新生過程において miRNA はあまり重要ではない可能性が示唆された。

血管内皮細胞を低酸素(1%酸素)条件下で培養し、TGF-β および BMP で 1 時間または 4 時間刺激したところ、TGF-β/ALK1 シグナルおよび BMP シグナルの増強が見られた。しかしながら Smad のタンパク量にはし変化が見られなかった。低酸素では血管新生を促進するシグナルが優位になる可能性が示唆された。

TGF-β/ALK1 シグナルは Id-1 を誘導して血管新生を促進する。そこで、Yeast Two Hybrid 法により Id-1 の新規標的分子 CGI-128 を同定し解析した。CGI-128 は DUF (Domain un function) ドメインを有する新規のタンパク質であり、DUF ドメインを介して Id-1 の HLH ドメインと結合することを発見した。

TGF-βII 型受容体リンパ管内皮細胞特異的に欠損させたマウス (TβRI<sup>F/F</sup>; Prox1-CreER) を作成し、解析した。胎生 10.5 および 11.5 日にタモキシフェンを母体へ腹腔内投与し、13.5 日に胎仔を摘出したところ、TβRI<sup>F/F</sup>; Prox1-CreER 胚では浮腫が確認された。そこでリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE1 抗体で全胚を染色したところ、血管内皮細胞特異的 Smad2/3 欠損マウス(Smad2<sup>F/F</sup>; Smad3<sup>-/-</sup>; Tie2-Cre(CDKO))マウスの血管構造と同様に、リンパ管構造が未熟である表現系を示した。つまり、TGF-β シグナルは血管だけでなくリンパ管の構

造安定化に必須のシグナルであることが示された。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yang W<sup>#</sup>, **Itoh F<sup>#</sup>**, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. (<sup>#</sup>equally contributed) Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci*, (2011)

Itoh S & **Itoh F**. Inhibitory machinery for the TGF-β family signaling pathway. *Growth Factors*, **5**, 163-173 (2011)

**伊東 史子**、加藤 光保: TGF-βシグナル研究—メカニズムの解明からあらたな治療へ。別冊・医学のあゆみ 43-47, (2011)

##### 2. 学会発表

**Itoh F**. TGF-β signaling regulates lymphangiogenesis in mice development. The 1<sup>st</sup> international symposium by JSPS Core-to-Core programs. Japan (2012)

**Itoh F**. Dicer-dependent miRNA pathway is important for early hematopoiesis but not for angiogenesis 第 19 回血管生物医学会学術集会 東京(2011)

**Itoh F**. Involvement of TGF-β/Smad pathway in lymphangiogenesis. JSPS-NOW Joint Seminar, Japan (2011) 招待講演

**Itoh F**. TGF-β/Smad pathway is involved in vessel integrity. TGF-β meeting. Sweden (2011)

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

#### F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。

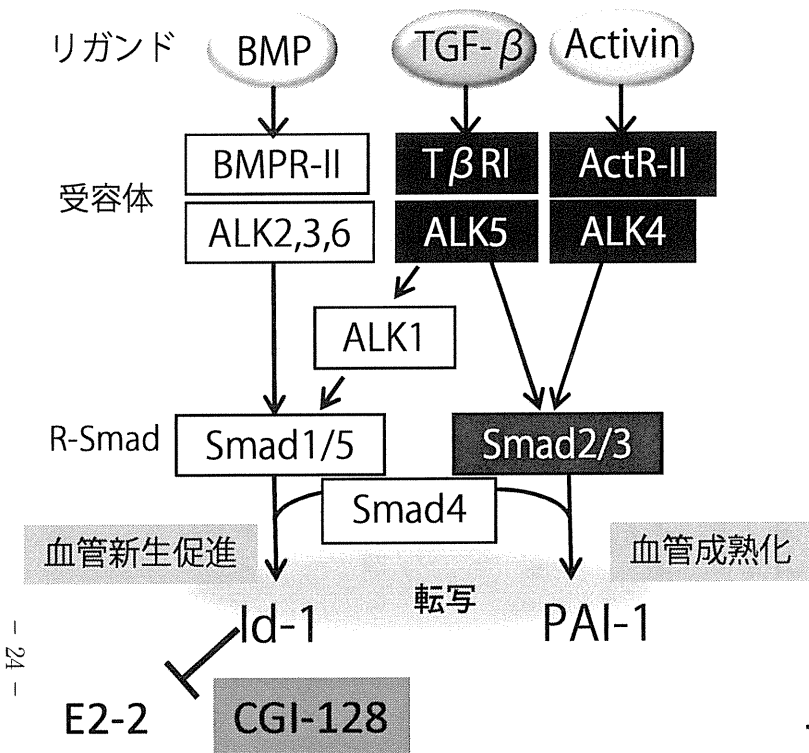


図1 TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの概略図  
TGF- $\beta$  シグナルは細胞膜上のI型(ALK5), II型受容体による、Smad2, Smad3のリン酸化を介して伝達される。しかし、Smad2, Smad3はアクチビンシグナルの伝達も担っている。



図2 血管内皮細胞特異的TGF- $\beta$ シグナル欠損マウス胎仔の表現系  
Smad2<sup>f/f</sup>;Smad3<sup>-/-</sup>;Tie2-Cre

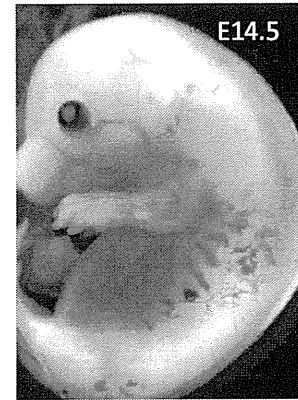
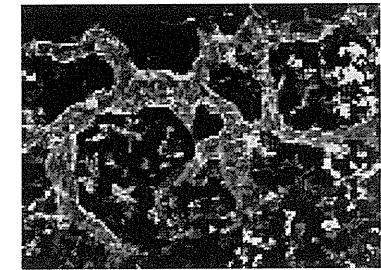


図3 リンパ管内皮細胞特異的TGF- $\beta$ シグナルマウス胎仔の表現系とリンパ管の構造  
リンパ管の構造が非常にごつごつしているのがわかる。同様の血管構造が図2の胎仔でも確認できた



Lyve-1(リンパ管マーカー)

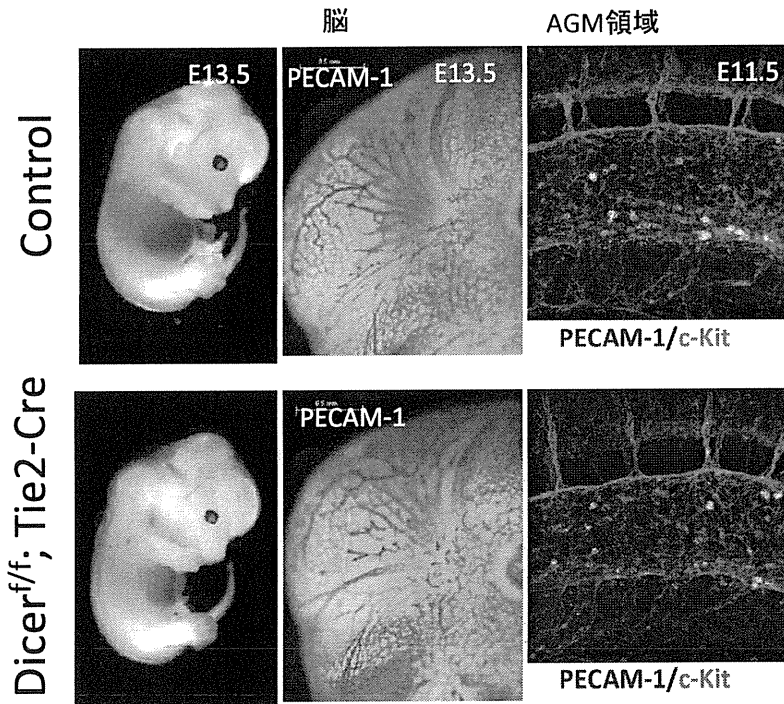


図4 血管内皮細胞特異的Dicer欠損マウス胎仔の表現系

胎生13.5日のマウスを比較すると肝臓が未熟であり、全体に青白く、血管構造または血球分化の異常が疑われた。血管内皮細胞のマーカーであるPECAM-1で脳を染色したところ、血管構造に異常はみられなかった。また胎生11.5日のAGM領域とPECAM-1と造血幹細胞のマーカーであるc-Kitで染色したが、やはり野生型と比較してDicer<sup>f/f</sup>;Tie2-Cre胎仔には異常が見られなかった。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

TGF- $\beta$ 1 負荷 BBB 障害モデル及び糖尿病性脳虚血再還流モデルの作成と BBB 保護薬の薬効検定

分担研究者	丹羽 正美	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
研究協力者	中川 慎介	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
	巽 理恵	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
	竹下 朝規	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科
	永田 泉	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科

研究要旨

Neurovascular Unit (NVU) の構成単位である血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) は虚血性脳血管病変における神経細胞救済のための標的システムである。BBB の機能維持 (BBB 保護) は、脳保護 (神経細胞保護) に繋がると考えられる。我々は血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル (BBB キット™、ファーマコセル株式会社) を用いて、遺伝性脳小血管病 (CARASIL) の病態に関与すると推測されている TGF- $\beta$  が BBB の機能を障害することを確認した。我々はこの TGF- $\beta$  による BBB 障害が抗血小板薬であるホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬 cilostazol で軽減されることを見出した。また、我々は、*in vitro* 低酸素再酸素を利用した脳虚血再還流 BBB モデルと後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) を組み合わせた、新しい糖尿病性脳虚血による BBB 障害モデルを作成した。この障害には TGF- $\beta$  が関与しており、cilostazol により BBB 機能障害が軽減した。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管病 (CARASIL) の脳小血管異常による多発性脳梗塞と白質脳症は、虚血再還流障害による神経細胞死を引き起こし血管認知症の原因となる。血液脳関門 (BBB) の保護が神経細胞を救済するため、BBB 保護薬の探索が必要である。本研究では、TGF- $\beta$  による BBB 機能障害モデルにおける、BBB 保護薬の探索を行った。候補薬として、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) candesartan および抗血小板薬であるホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬 cilostazol の BBB 保護効果を検証した。また、糖尿病性虚血障害モデルにおける TGF- $\beta$  の関与についても検討した。

たことを確認し、TGF- $\beta$  (1 ng/ml) を上部チャンバー (管腔側) に添加した。その後、最長 48 時間まで TEER を測定した。Cilostazol (1~30  $\mu$ M) および、candesartan (10 nM, 100 nM) は TGF- $\beta$  と同時に添加した。また、TGF- $\beta$  の BBB タイトジャンクション構成タンパク質 (TJs) である ZO-1、occludin、claudin-5 への影響を western blot 法で確認した。

B. 研究方法

① TGF- $\beta$  負荷における BBB 保護薬の検討: BBB キット作製 4 日後に経内皮電気抵抗 (TEER) を測定し、十分なバリアー機能が形成され

② 糖尿病性脳虚血再還流 BBB モデルの作成: 虚血開始前の BBB キットの電気抵抗 (TEER) を測定後、血清なしの DMEM (glucose free) に交換し、酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を 3 時間行った。その後、通常の培地に交換し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6、24 時間 (hr) インキュベートした。後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) として AGE-BSA (BioVision 社)、コントロールとして BSA



(BioVision社)を200 μg/mlの濃度で虚血時及び再酸素時に作用させた。BBB機能の評価としてTEER(経内皮電気抵抗)の測定を行った。

### C. 研究結果

(1) TGF-β負荷におけるBBB保護薬の検討: TGF-βの添加3時間後には、非添加群と比べ有意にTEERが低下し、48時間後まではTEERの低下が継続した。cilostazolの処置により、TGF-βによるTEERの低下は改善され、24時間後までその効果は持続した。candesartan処置群では、添加後24、48時間後にTGF-βによるTEER低下を改善させる傾向は見られたものの、有意な効果は見られなかった。Cilostazolには、TGF-β処置によるBBB機能障害を防止する効果があることが示唆される。また、TGF-βの投与により、ZO-1、occludin、claudin-5の減少が観察され、cilostazolには、この減少を軽減させる効果が見られた。

(2) 糖尿病性脳虚血によるBBB障害モデルの評価: TEERは、再酸素後6、24時間で有意に低下し、AGEの添加により更にその低下は亢進した。タイトジャンクションタンパクの顕微鏡的免疫蛍光細胞像検査において、AGE併用群でTJs機能低下を示すspindle-like形態の崩壊とclaudin-5の不連続な発現が見られた。BBB機能障害が発症していることが確認された。再酸素負荷後、上部チャンバー(管腔側)のadrenomedullin(内皮細胞から産生されBBB機能を向上させるオートクライン因子)濃度、およびNO<sub>2</sub>とNO<sub>3</sub>量にコントロールとAGE処理群では有意な変化は見られなかったが、TGF-β濃度は、AGE処理群で有意に増加していた。さらに、この糖尿病性脳虚血によるBBB-TJs機能障害は、TGF-β受容体(ALK4、ALK5、ALK7)の阻害剤であるA83-01(1 μM)で回復した。以上から、この糖尿病性脳虚血によるBBB障害モデルにTGF-βシグナルが関与していると考えられる。また、この糖尿病性虚血BBB障害モデルに、cilostazolを投与すると、その障害が軽減されたことから、BBB保護薬としての可能性が示唆された。

### D. 研究発表

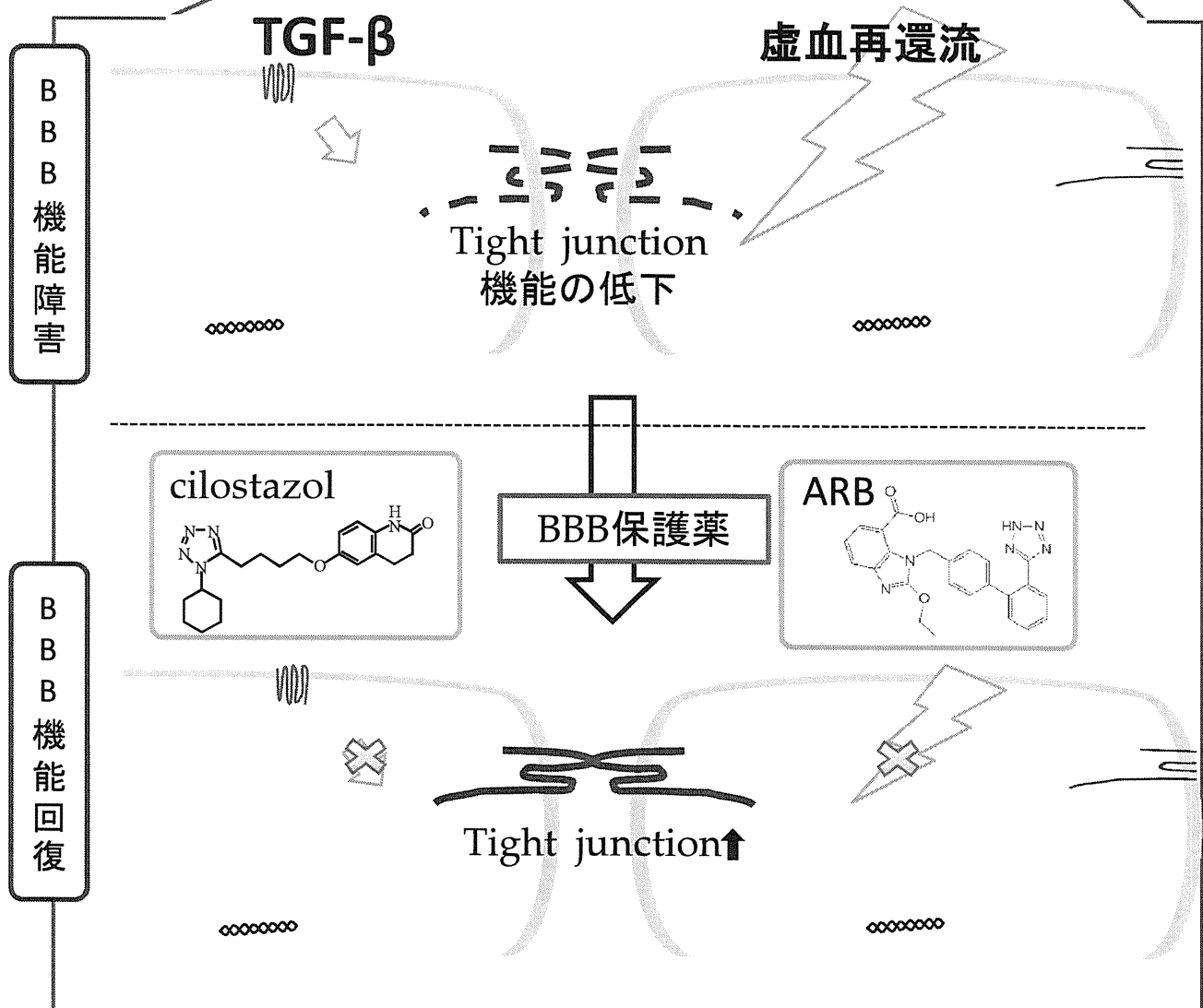
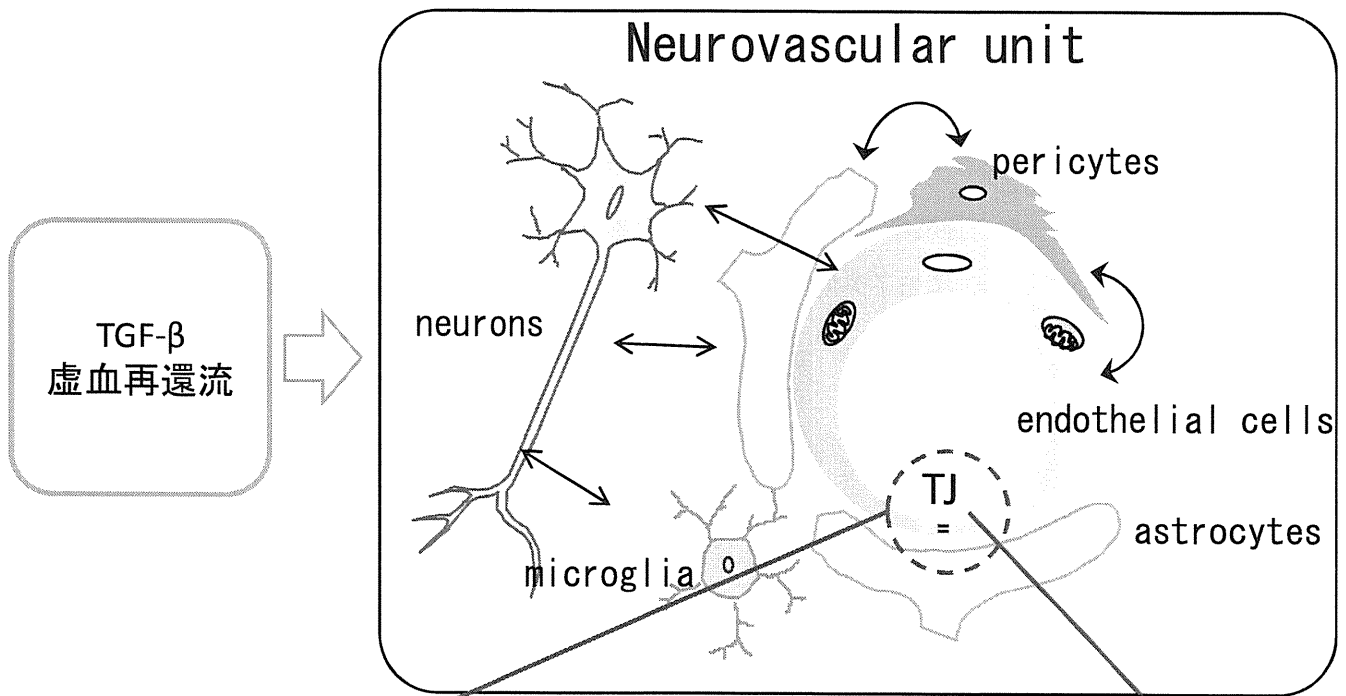
- 論文発表 ①Toth A, Veszelka S, Nakagawa S, Niwa M, Deli MA: Patented *in vitro* blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 6: 107-118, 2011 (doi:10.2174/157488911795933910) ②Yang WM, Jung KJ, Lee MO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW: Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 31:93-99, 2011 (doi:10.1007/s10571-010-9558-0) ③Ta-tsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N: Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation* 20:1423-30, 2011 (doi:10.3727/096368910X547444) ④Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M: Lercanidipine rescues hippocampus pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death in SHRSP. *Cell Mol Neurobiol* 31: 561-567, 2011 (doi:10.1007/s10571-011-9649-6)
- 学会発表 ①Takeshita T et al. Cilostazol rescues AGE-related ischemic BBB damage. 14<sup>th</sup> Intern Symp Signal Transduction in the BBB, Istanbul Sep7-9, 2011 ②So G et al. The effect of candesartan on blood-brain barrier. 第84回日本薬理学会年会(誌上開催), 2011, *J Pharmacol Sci* 115 (Suppl 1): 141, 2011 ③Yamada N et al. Comparison between *in vitro* BBB effects of HGF and TGF-β. 同上, 2011, *J Pharmacol Sci* 115 (Suppl 1): 200, 2011

### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)なし

### F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)なし



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

CARASIL 原因遺伝子: HtrA1 遺伝子欠損マウスと CARASIL 剖検脳の脳血管病理解析に関する研究

分担研究者	佐藤 俊哉	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
研究協力者	加藤 泰介	新潟大学脳研究所神経内科
	関根 有美	新潟大学脳研究所神経内科
	廣川 祥子	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

High temperature requirement A1 (HtrA1) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、HtrA1 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因であることが推測されている (Hara K et al., N Eng J Med 2009)。CARASIL 患者の脳血管では血管平滑筋細胞の消失をはじめ、弾性板解裂、内膜肥厚化、血管腔拡大などの病理学的所見が存在する。われわれは HtrA1 機能喪失による脳血管への影響を検討する目的で、HtrA1 ノックマウス (HtrA1-KO マウス) の脳血管異常を病理学的に解析した。また、脳内での HtrA1 の正確な発現分布は知られていないため、われわれは in situ hybridization による HtrA1 発現細胞の特定を行った。

これまでに 4, 8, 16, 20 ヶ月齢のマウスを用いた解析により、HtrA1-KO マウスは加齢依存的 (16 ヶ月齢以降) に CARASIL 病態の一つである血管平滑筋細胞の変性を示すという所見を得ていた。そこで、今回われわれは 20 ヶ月例以降のマウスを用いて、蛍光組織染色による血管平滑筋細胞変性の半定量的解析を行った。また脳実質内の細小血管におけるペリサイトに関しても coverage (被覆率) の評価を行った。その結果、血管平滑筋細胞の有意な血管壁占有面積の低下と coverage の低下が高齢期の HtrA1-KO マウス脳血管で見つかった。予備実験段階ではあるが、16 ヶ月齢の HtrA1-KO では血管平滑筋細胞マーカーの染色強度は低下しているものの、占有面積には差は見られなかった。このことか HtrA1-KO マウスの血管平滑筋細胞の変性は高齢期において緩慢に発症・進行しているものと考えられる。

また、in situ hybridization 解析の結果、脳内においてアストロサイトにのみ明瞭な HtrA1 の発現が認められた。アストロサイトは血管内皮細胞・血管平滑筋細胞/ペリサイトと共に neuro-vascular unit を構成し脳血管機能調節に関わる細胞である。強い HtrA1 の発現がアストロサイト特異的に見られたことから、アストロサイトにおける HtrA1 の機能喪失が CARASIL の病態背景に関わっていることが予想される。

A. 研究目的

脳小血管病は脳血管を病変の首座とし、平滑筋細胞消失、内膜肥厚、弾性板解裂といった変性をきたす。また大脳白質に虚血性変化

に類似した脱髄 (leukoaraiosis) を示す。本症はアルツハイマーと並ぶ、認知症の大きな原因で考えられているが、発症原因は不明である。遺伝性脳小血管病; CARASIL は孤発性の脳小血管病に病態が酷似し、CARASIL の発

症メカニズムの解明は、孤発性脳小血管病研究に大きく寄与することが予想される。

本研究は、主に CARASIL 原因遺伝子 ; HtrA1 の KO マウスを研究対象とし、HtrA1 の機能喪失がどのように CARASIL 病態を発症させるのかを明らかにすることが目的である。

## B. 研究方法

### ・ HtrA1-KO マウス脳血管解析

20 ヶ月齢~の高齢マウス固定脳をサンプリングした。血管平滑筋細胞をマーカータンパク質である  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$  SMA) で染色し、①血管壁面積に対する血管平滑筋細胞の占有比 ②  $\alpha$  SMA 染色強度 ③血管平滑筋細胞数 という3点を指標に血管平滑筋細胞変性を半定量的に評価した。

ペリサイトは、細小血管内皮細胞を lectin によって、ペリサイトをマーカータンパク質である aminopeptidase-N によって二重染色を施した組織切片から共焦点画像を取得し、imaris を用いて作製した 3D 画像内の lectin 陽性の細小血管の面積に対する aminopeptidase-N の面積比を求め、ペリサイト coverage (被覆率) を算出、比較した。

### ・ HtrA1 in-situ-hybridization 解析

脳内 HtrA1 発現細胞の解析は、HtrA1 anti-sense RNA probe による in situ hybridization と免疫染色を組み合わせで行った。各細胞マーカーとして、神経細胞: NeuN, アストロサイト: GFAP, ミクログリア: Iba-1, 血管内皮細胞: CD31, 血管平滑筋細胞:  $\alpha$  SMA を用いた。

## (倫理面への配慮)

CARASIL 患者剖検脳は、病理解析前にご家族に研究についての同意を得た。また個人情報保護に努め行った。

## C. 研究結果

血管平滑筋細胞変性の解析の結果、20 ヶ月齢の HtrA1-KO マウスでは血管平滑筋細胞マーカーの染色強度と血管壁面積に対する占有比が

wildtype (WT) マウスに比して有意に低下していることが示された。一方で、血管平滑筋細胞数には差は見られなかった。さらに HtrA1-KO マウスでは通常の血管平滑筋細胞がとる多層構造が失われ、単層構造へと変化していた。また、ペリサイト coverage では、n=3 の解析では有意差は得られなかったものの低下傾向を示していた。

In situ hybridization による発現細胞解析の結果 HtrA1 の発現は血管壁細胞には見られず、脳内グリアの一つであるアストロサイトに発現していることが分かった。また、HtrA1 は神経細胞の一部にも微弱な発現が見られた。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

(発表誌名・巻号・頁・発行年等も記入)

## E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

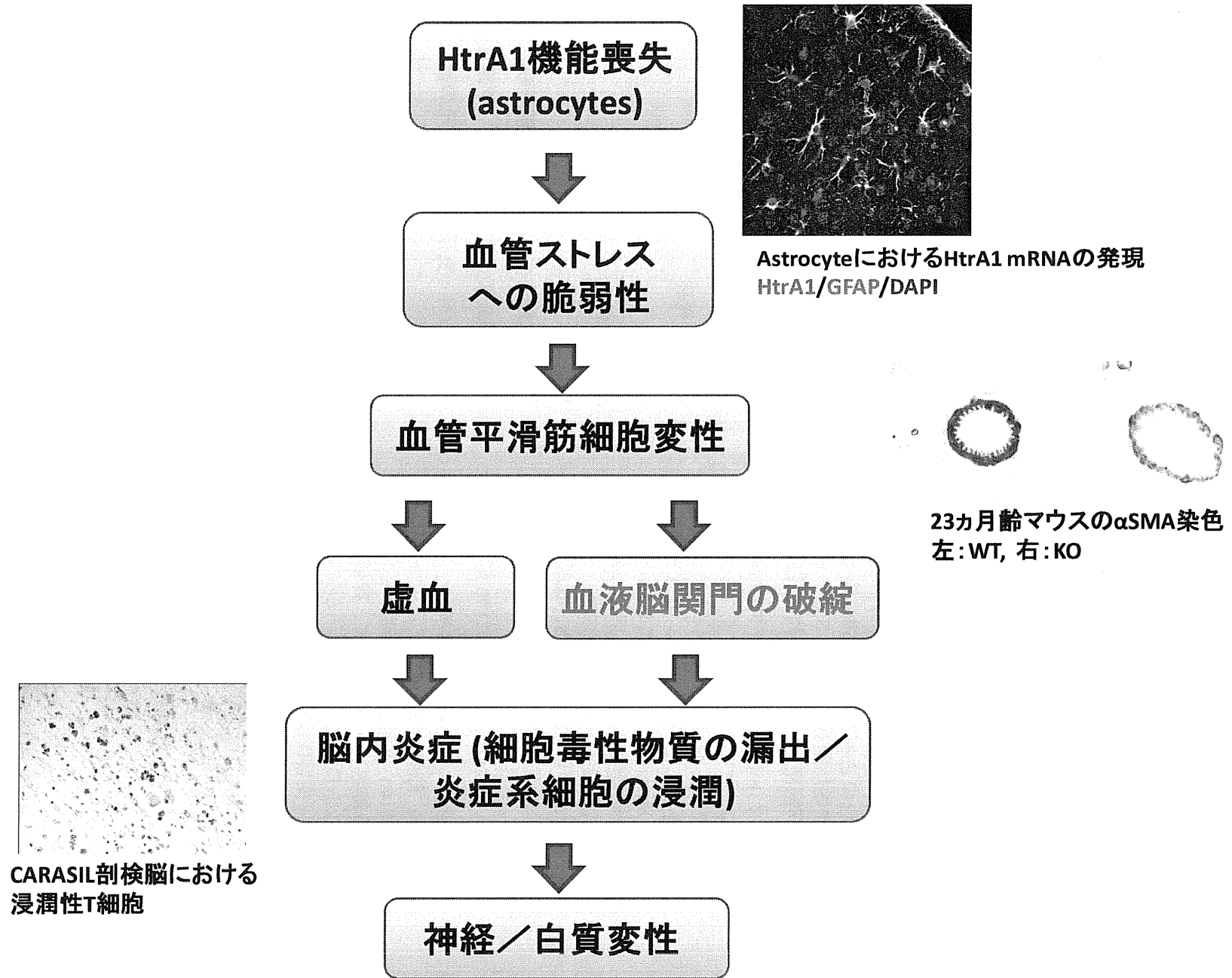
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

## F. 健康危険情報

なし

# 図1. CARASILの病態期機序



### Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

伊藤 史子

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊東史子	TGF-βファミリーによる血管新生制御機構	宮園浩平・宮澤恵二	TGF-βシグナル研究	医歯薬出版株式会社	日本	2011	43-47
伊東史子	Smad, 胚対外血管系と造血		血管生物医学事典	朝倉出版	日本	2011	401-402 47-48

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yang W <sup>#</sup> , <b>Itoh F<sup>#</sup></b> , Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. ( <sup>#</sup> equally contributed)	Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2.	<i>Cancer Sci.</i>	102	1808-14	2011
Itoh S & <b>Itoh F.</b>	<u>Inhibitory machinery for the TGF-β family signaling pathway.</u>	<i>Growth Factors</i>	5	359-365	2011

富本 秀和

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
富本秀和	皮質下血管性認知症、認知症疾患における位置づけ。	臨床神経学	51(11)	940-942	2011

平野 輝之

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
植田明彦、平野照之	遺伝性脳血管障害における分子血管破綻	分子脳血管病	第10巻 3号	45-49	2011年

小野寺 理 西澤 正豊

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O	Dysregulation of TGF-beta family signaling and hereditary cerebral small vessel disease: insight into molecular pathogenesis of CARASIL	Nihon NaikaGakkaiZasshi	100巻8号	2207-2213	2011
Atsushi Shiga,Hiroaki Nozaki,Akio Yokoseki,Megumi Nishimatsu,HirotohiKawata,TaisukeKato,Akihide Koyama, KunimasaArima, Mari Ikeda,Shinichi Katada,Yasuko Toyoshima,Hitoshi Takahashi, Akira Tanaka,Imaharu Nakano,Takeshi Ikeuchi, MasatoyoNishizawa,Osamu Onodera.	Cerebralsmall-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta1 via cleavage of proTGF-beta1	HumanMolecular Genetics	20巻9号	1800-1810	2011
野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理.	CARASILの臨床・病理像と病態機序 (解説)	Annual Review 神経		251-259	2011



丹羽 正美

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toth A, Veszelka S, Nakagawa S, Niwa M, De li MA	Patented <i>in vitro</i> blood-brain barrier models in CNS drug discovery.	Recent Patents on CNS Drug Discovery	6	107-118	2011
Yang WM, Jung KJ, LeeMO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW	Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain	Cellular and Molecular Neurobiology	31	93-99	2011
Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M	Lercanidipine rescues hippocampus pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death inSHRSP	Cellular and Molecular Neurobiology	31	561-567	2011
Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N	Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells.	Cell Transplantation	20	1423-1430,	2011

水野 敏樹

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujiwara Y, Mizuno T, Okuyama C, Nagakane Y, Watanabe-Hosomi A, Kondo M, Kuriyama N, Tokuda T, Matsushima S, Tsunehiko N, Nakagawa M.	Simultaneous impairment of intracranial and peripheral artery vasoreactivity in CADASIL patients.	Cerebrovasc Dis	33	128-134	2012
Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T.	Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3.	Exp Neurol.	233	p303-311	2012
瀬尾和弥 栗山長門 奥田求己 久保秀一 松井知之 増田隆司 工藤有里子 武澤信夫 長谷 斉 水野敏樹 中川正法	パーキンソン病患者の歩行障害に対する3次元動作解析の試み.	総合リハビリテーション	39 (1)	p57-62	2011

